

08.10.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月21日
Date of Application:

出願番号 特願2003-360550
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-360550]

出願人 富士写真フイルム株式会社
Applicant(s):

REC'D 02 DEC 2004

WIPO

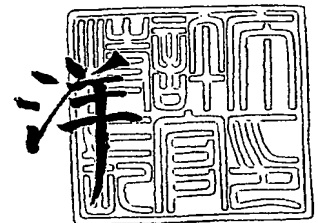
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3105213

【書類名】 特許願
【整理番号】 0310039
【提出日】 平成15年10月21日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/10
A61M 1/34
B01D 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町 2 丁目 1 2 番 1 号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 繁定 啓司

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町 2 丁目 1 2 番 1 号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 藤原 盛男

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 森 寿弘

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100064414
【弁理士】
【氏名又は名称】 磯野 道造
【電話番号】 03-5211-2488

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015392
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0016369

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

第 1 開口と第 2 開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第 1 開口側から前記第 2 開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、

前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第 2 開口とを連通する排出部とを有し、

前記底部は、底面と、前記底面に形成された複数の突起とを有し、

前記複数の突起は、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されていることを特徴とする核酸分離精製カートリッジ。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸分離精製カートリッジ

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸分離精製カートリッジに関する。より詳細には、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、第1開口側から第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野において種々の形態で使用されているが、多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、単離および精製操作が煩雑で時間を要する。

【0003】

この核酸を簡便かつ効率的に分離精製する方法として、少なくとも2個の開口を有する容器内に、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いた方法が、特許文献1に記載されている。この方法は、まず、核酸を含む試料溶液中に、前記核酸分離精製ユニットの一の開口を没入させる。次いで、他の一の開口に接続された圧力差発生装置を用いて、前記核酸分離精製ユニットの内部を減圧状態にして、試料溶液を容器内に吸入する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中に存在する核酸が固相に吸着する。続いて、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した試料溶液を排出する。

【0004】

次に、前記と同様の減圧-加圧操作で洗浄液を容器内に吸入した後、容器から排出して容器内を洗浄する。この洗浄液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。更に、固相に吸着した核酸を離脱させるための回収液を、上記と同様の減圧-加圧操作によって容器内に吸入し、容器から排出する。この排出された回収液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収することにより分離精製が完了する。

【特許文献1】特開2003-128691号公報（段落0032～0050、図1）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1に記載の核酸分離精製方法では、洗浄液にて洗い流す際、出来るだけ容器内に洗浄液が残留しないのが望ましい。洗浄液が残留した状態で、回収液にて核酸を回収すると、排出された回収液に洗浄液が混入し、この混入した洗浄液の濃度によっては、次工程、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）等において、悪影響を及ぼすおそれがある。

【0006】

本発明は、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、第1開口側から第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジを用いて核酸の分離精製を行う際に、洗浄工程において、洗浄液が容器内に残留し難い（洗浄液が排出され易い）核酸分離精製カートリッジを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記課題を解決した本発明は、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する

底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、前記底部は、底面と、前記底面に形成された複数の突起とを有し、前記複数の突起は、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されていることを特徴とする。

【0008】

本発明の核酸分離精製カートリッジによれば、底面に設けられた複数の突起が、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されているため、洗浄工程において、洗浄液を加圧ガスにより通流させる際、核酸吸着性多孔性膜が突起に沿って、排出部側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液が筒状本体の底部に残留することなく、速やかに排出部から排出される。

【0009】

また、前記複数の突起は、好ましくは前記底部開口から放射状に延びる複数のリブである。この場合、前記リブは3本以上であることが好ましい。なお、前記筒状体の径方向に対するそれぞれの前記リブの傾斜角度は、好ましくは 3° 以上、より好ましくは 5° 以上である。

【0010】

また、前記底面は、前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位する傾斜を有することが好ましい。これにより、洗浄液がより速やかに排出される。また、前記筒状体の径方向に対する前記底面の傾斜角度は、好ましくは 10° 以上、より好ましくは 15° 以上、最も好ましくは 20° 以上である。

【0011】

また、前記リブは、頂部が円弧状に形成されているのが好ましい。これにより、リブの頂部と核酸吸着性多孔性膜との間に洗浄液が滞留し難くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。また、前記核酸分離精製カートリッジは、内面に存在する角部および隅部が円弧状に形成されているのが好ましい。これにより、内面に存在する角部および隅部に、洗浄液が滞留し難くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。なお、リブの頂部の曲率半径はリブ幅に対して $1/4$ 以上が好ましく、より好ましくは $1/3$ 以上、最も好ましくは $1/2$ 以上である。また、角部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.2mm 以上、最も好ましくは 0.3mm 以上である。また、隅部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.15mm 以上、最も好ましくは 0.2mm 以上である。

【0012】

また、前記筒状体の軸と前記筒状体の内周面とがなす角度は、好ましくは 10° 以下、より好ましくは 5° 以下である。これにより、洗浄液が筒状体の内周面を伝って流れ易くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。

【0013】

また、前記核酸分離精製カートリッジの内壁面には、前記洗浄液の液滴の接触角が 80° 以下または 90° 以上となるような材質、あるいはそのような接触角となるように表面処理が行われた材質を用いるのが好ましい。接触角が 80° 以下の場合、核酸分離精製カートリッジの内壁面に対する洗浄液の濡れ性が向上し、洗浄液が液滴として残留し難くなるため、洗浄液がより速やかに排出される。なお、濡れ性を更に向上させるためには、接触角は 60° 以下がより好ましく、 50° 以下が最も好ましい。

また、接触角が 90° 以上の場合、核酸分離精製カートリッジの内壁面に洗浄液が液滴として残留しても、その液滴は表面張力により略球状となるため、加圧ガスにより除去し易くなる。これにより、洗浄液がより速やかに排出される。

【0014】

また、前記核酸吸着性多孔性膜は、その周縁部が潰れた状態で保持されるのが好ましい。核酸吸着性多孔性膜は孔部を有するため、その周縁部が潰れた状態で保持されると、孔

部が塞がるようにして潰れるため、その部分からは液体が流れなくなる。これにより、核酸吸着性多孔性膜を通るべき液体（試料溶液等）が、核酸吸着性多孔性膜の側部に回り込む不具合を防ぐことができる。

【発明の効果】

【0015】

このような核酸分離精製カートリッジによれば、洗浄工程において、洗浄液が核酸分離精製カートリッジの内部に残留せずに、速やかに排出されるので、排出された回収液への洗浄液の混入を抑えることができる。これにより、次工程において、洗浄液に起因する不具合を未然に防ぐことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

次に、本発明の実施形態について、適宜図面を参照しながら説明する。参照する図1は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図であり、図2は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図であり、図3は、本発明の一実施形態に用いられるキャップの拡大断面斜視図であり、図4は、図3のX-X線断面図であり、図5は図2のA部における拡大図であり、図6は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの洗浄工程を示す断面図である。なお、以下の説明において、「上」、「下」の表現は、図2を基準とする。

【0017】

図1に示すように、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ1は、核酸吸着性多孔性膜Fと、核酸吸着性多孔性膜Fを保持するとともに、液体が通流する通路を形成するバレル10およびキャップ20とから構成されている。

【0018】

バレル10は、円筒状のバレル本体部12と、バレル本体部12に連なる円筒状のバレル側嵌合部13とからなり、バレル本体部12の上部には開口11a、バレル側嵌合部13の下部には開口11bが形成されている。そのため、バレル10の上方から下方に向けて、液体が通流可能である。また、バレル側嵌合部13の外径は、バレル本体部12の外径より一回り小さくなっている。

【0019】

キャップ20は、円筒状のキャップ側嵌合部22と、キャップ側嵌合部22の底部22aに設けられた開口23に連なる排出部24とからなる。底部22aに設けられた開口23は、前記したバレル本体部12の上部に設けられた開口11aより小さい径を有している。また、キャップ側嵌合部22の上部には開口21a、排出部24の下部には開口21bが形成されている。そのため、キャップ20の上方から下方へ向けて、液体が通流可能である。また、キャップ側嵌合部22の内径は、前記バレル10のバレル側嵌合部13の外径と嵌合可能な直径に形成されている。

【0020】

そして、図2に示すように、キャップ20のキャップ側嵌合部22の底部22aに、核酸吸着性多孔性膜Fを配置した状態で、バレル10のバレル側嵌合部13をキャップ20のキャップ側嵌合部22へ嵌入することで、核酸吸着性多孔性膜Fをバレル10とキャップ20との間で挟持することができる。なお、開口11aおよび開口21bはそれぞれ、特許請求の範囲にいう「第1開口」および「第2開口」に相当し、バレル10およびキャップ20は特許請求の範囲にいう「筒状体」に相当し、バレル10およびキャップ側嵌合部22は特許請求の範囲にいう「筒状本体」に相当し、キャップ側嵌合部22の底部22aは特許請求の範囲にいう「底部」に相当し、開口23は特許請求の範囲にいう「底部開口」に相当し、排出部24は特許請求の範囲にいう「排出部」に相当する。

【0021】

キャップ20は、図3に示すように、キャップ側嵌合部22の底面22bに、6本（図においては3本のみ図示）の放射状のリブ26が形成されている。このリブ26は、核酸分離精製カートリッジ1が組み立てられた状態において、それぞれの外周側端部26aの

頂部 26 c が核酸吸着性多孔性膜 F に当接し、核酸吸着性多孔性膜 F を支持している (図 2 参照)。また、リブ 26 は、核酸分離精製カートリッジ 1 の使用時において、核酸吸着性多孔性膜 F が開口 23 に近づくほど排出部 24 の方へ変位するように、外周側端部 26 a から内周側端部 26 b に向けて、排出部 24 側に傾斜している。また、底面 22 b の外周縁には、リブ 26 の外周側端部 26 a に連なるように、底面 22 b から一段高くなった挟持面 25 が、全周にわたって形成されている。この挟持面 25 は、バレル 10 の開口 11 b の端縁にあたる開口縁部 14 (図 1 参照) との間で、核酸吸着性多孔性膜 F を挟持する面である。この挟持面 25 の幅は、開口縁部 14 の幅に合わせて形成するのが好ましい。なお、リブ 26 は特許請求の範囲にいう「突起」の一例であり、「突起」は必ずしもリブ形状でなく、山形の突起を複数散点的に形成してもよい。

【0022】

リブ 26 は、放射状に形成されているため、液体を上方から下方へ流した際に、液体が排出部 24 へスムーズに流れ込むようになっている。

また、リブ 26 は、外周側端部 26 a から内周側端部 26 b に向けて、その頂部 26 c が排出部 24 側に傾斜しているため、洗浄工程において、後記する洗浄液 W (図 6 参照) を加圧ガスにより通流させる際、核酸吸着性多孔性膜 F がリブ 26 の頂部 26 c に沿って、排出部 24 側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液 W が、底部 22 a に残留することなく、速やかに排出部 24 から排出される。なお、キャップ側嵌合部 22 の径方向に対するリブ 26 の傾斜角度 $\theta 1$ (図 5 参照) は、好ましくは 3° 以上、より好ましくは 5° 以上である。

【0023】

また、図 4 に示すように、リブ 26 は、横断面で見たときに、頂部 26 c が円弧状に形成されている。これにより、リブ 26 の頂部 26 c と核酸吸着性多孔性膜 F との間に洗浄液 W が滞留し難くなるので、洗浄液 W がより速やかに排出される。なお、リブ 26 の頂部 26 c の曲率半径はリブ 26 の幅に対して $1/4$ 以上が好ましく、より好ましくは $1/3$ 以上、最も好ましくは $1/2$ 以上である。

【0024】

次に、核酸分離精製カートリッジ 1 の断面形状について、図 5 を参照して説明する。図 5 に示すように、キャップ側嵌合部 22 の底面 22 b は、開口 23 に近づくほど排出部 24 の方へ変位する傾斜を有している。これにより、洗浄液 W がより速やかに排出される。また、キャップ側嵌合部 22 の径方向に対する底面 22 b の傾斜角度 $\theta 2$ は、好ましくは 10° 以上、より好ましくは 15° 以上、最も好ましくは 20° 以上である。

【0025】

また図 5 に示すように、核酸分離精製カートリッジ 1 は、内面に存在する角部 (例えば開口 23 の縁部 23 a 等) および隅部 (例えば底面 22 b の外周縁部 22 c 等) が円弧状に形成されている。これにより、内面に存在する角部および隅部に、洗浄液 W が滞留し難くなるので、洗浄液 W がより速やかに排出される。なお、角部の曲率半径は 0.1 mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.2 mm 以上、最も好ましくは 0.3 mm 以上である。また、隅部の曲率半径は 0.1 mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.15 mm 以上、最も好ましくは 0.2 mm 以上である。

【0026】

また、バレル 10 の軸とバレル 10 の内周面 10 a とがなす角度 $\theta 3$ は、好ましくは 10° 以下、より好ましくは 5° 以下である。これにより、洗浄液 W がバレル 10 の内周面 10 a を伝って流れ易くなるので、洗浄液 W がより速やかに排出される。

【0027】

また、核酸吸着性多孔性膜 F は、バレル 10 の開口縁部 14 とキャップ 20 の挟持面 25 との間に、その周縁部 F a が潰れた状態で保持されている。これにより、核酸吸着性多孔性膜 F を通るべき液体 (試料溶液等) が、核酸吸着性多孔性膜 F の側部 F b に回り込む不具合を防ぐことができる。この核酸吸着性多孔性膜 F を安定して保持するためには、開口縁部 14 と挟持面 25 とを超音波溶着等により固着するのが好ましい。

【0028】

なお、バレル10およびキャップ20の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル等のプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好適に使用することができる。また、バレル10およびキャップ20は透明であっても、着色してあってもよい。

【0029】

核酸吸着性多孔性膜Fとしては、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する多孔性膜が好適である。より好適には、核酸吸着性多孔性膜Fは、親水基を有する多孔性膜であり、多孔性膜を形成する材料自体が、親水基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理もしくはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜である。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでもよい。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜等を使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子等の有機材料を用いることが好ましい。

【0030】

親水基を有する多孔性膜としては、水酸基を有する有機材料の多孔性膜を挙げることができる。水酸基を有する有機材料としては、前記した特許文献1に記載のアセチルセルロースの表面鹸化物が挙げられる。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースのいずれでもよいが、特にトリアセチルセルロースが好ましい。この場合、鹸化処理の程度（鹸化度）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。核酸の分離効率を上げるためには、水酸基の量（密度）が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロース等のアセチルセルロースの場合には、鹸化率が5%以上であることが好ましく、10%以上であることがより好ましい。また、鹸化処理の程度（鹸化度）と多孔性膜の孔径との組合せにより、固相内部の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。この場合、多孔性膜は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、表裏非対称性の多孔性膜を好適に使用することができる。

【0031】

また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜として、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物からなる有機高分子の多孔性膜も好適に使用することができる。特にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物としては、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好適に使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、99:1~1:99である事が好ましい。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、90:10~50:50である。

【0032】

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物も使用する事ができる。

【0033】

また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料からなる多孔性膜を挙げることができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料は、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の鹸化物を好適に使用することができる。トリア

セチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、99:1~1:99である事が好ましい。さらには、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、90:10~50:50である事が好ましい。

【0034】

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料として、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物も使用する事ができる。

【0035】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、厚さが10~500 μ mである多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、厚さが50~250 μ mである多孔性膜を使用する事ができる。

【0036】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最小孔径が0.22 μ m以上である多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、最小孔径が0.5 μ m以上である多孔性膜を使用する事ができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、最大孔径と最小孔径の比が5以上である多孔性膜を使用する事ができる。

【0037】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、空隙率が50~95%である多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、空隙率が65~80%である多孔性膜を使用する事ができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、バブルポイントが、0.1~10kgf/cm²である多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、バブルポイントが、0.2~4kgf/cm²である多孔性膜を使用する事ができる。

【0038】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、圧力損失が、0.1~100kPaである多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、圧力損失が、0.5~50kPaである多孔性膜を使用する事ができる。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ100 μ mあたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

【0039】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.1 μ g以上である多孔性膜を好適に使用する事ができる。より好適には、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.9 μ g以上である多孔性膜を使用することができる。

【0040】

[核酸分離精製カートリッジ1の使用方法]

核酸分離精製カートリッジ1を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、この工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。これにより、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、核酸を得ることが可能になる。

【0041】

例えば、前記した自動装置(図示せず)は、核酸分離精製カートリッジ1のバレル10の開口11aから排出部24の開口21bへ向けて、核酸を含む試料溶液を、加圧ガスの一例である加圧エアにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜Fに核酸を吸着させた後、同様に洗浄液Wを通流させて不純物を除去し、続いて、同様に回収液を通流させて核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を離脱させ、回収液と共に回収する分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、核酸分離精製カートリッジ1と試料溶液および洗浄液Wの排出液を収容する廃液容器と核酸を含む回収液を収容する回収容器とを保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジ1に加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、核酸分離精製カートリッジ1に洗浄液Wおよび回収液を分注する分注機構とを備えているものを使用することができる。

【0042】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、このスタンドに上下移動可能に支持され核酸分離精製カートリッジ1を保持するカートリッジホルダーと、このカートリッジホルダーの下方で核酸分離精製カートリッジ1に対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

【0043】

また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、このエアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された核酸分離精製カートリッジ1に対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、この加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジ1の位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

【0044】

また、前記分注機構は、洗浄液Wを分注する洗浄液分注ノズルと、回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し、前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ1上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液Wを収容した洗浄液ボトルより洗浄液Wを吸引し、前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を収容した回収液ボトルより回収液を吸引し、前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

【0045】

本発明において使用できる検体に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（またはその一部）、動物（またはその一部）等、あるいはそれらの溶解物およびホモジネート等の生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0046】

核酸を含む試料溶液は、前記した検体について、細胞膜および核膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理することにより得られる。例えば、検体が全血の場合、これに塩酸グアニジン、Tris、Triton-X100、プロテアーゼK（SIGMA製）を添加し、60℃で10分インキュベートすることによって赤血球の除去、各種タンパク質の除去、白血球の溶解及び核膜の溶解がなされる。

【0047】

続いて、核酸分離精製カートリッジ1の作用および効果について説明する。

まず、核酸を含む試料溶液を、バレル10の開口11a（図2参照）から排出部24の開口21bへ向けて、加圧エアにより通流させる。これにより、試料溶液中の核酸が核酸吸着性多孔性膜Fに吸着される。

【0048】

次に、図6に示すように、洗浄液Wをバレル10の開口11aから排出部24の開口21bへ向けて加圧エアにより通流させる。この洗浄液Wは、核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を離脱させずに、不純物を離脱させる組成を有するものである。この洗浄工程において、洗浄液Wを加圧エアにより通流させる際、図6に示すように、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ26の傾斜形状に沿って、排出部24側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液Wが、底部22a、特に核酸吸着性多孔性膜Fとバレル10の内周面10aとにより形成される隅部27に残留することなく、速やかに排出部24から排出される。

【0049】

この際、核酸分離精製カートリッジ1の内壁面（バレル10の内周面10a等）に対する洗浄液Wの液滴Wdの接触角が90°以上の場合は、例えば、図6に示すように、バレル10の内周面10aに液滴Wdとして残留しても、その液滴Wdは表面張力により略球状となるため、加圧エアにより除去し易くなる。これにより、洗浄液Wがより速やかに排出される。

また、核酸分離精製カートリッジ1の内壁面に対する洗浄液Wの液滴Wdの接触角が80°以下である場合は、核酸分離精製カートリッジ1の内壁面に対する洗浄液Wの濡れ性

が向上し、洗浄液Wが液滴Wdとして残留し難くなるため、洗浄液Wがより速やかに排出される。

【0050】

また、洗浄液Wは、水溶性有機溶媒および塩の双方、または水溶性有機溶媒もしくは塩のうちいずれか1つを含んでいる溶液であることが好ましい。アルコール等の水溶性有機溶媒は、核酸が難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を離脱させるのに適している。また、塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まる。

【0051】

洗浄液Wに含まれる水溶性有機溶媒として、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、アセトン等を用いることができるが、エタノールを用いることが好ましい。また、洗浄液W中に含まれる水溶性有機溶媒は、好ましくは20～100容量%であり、より好ましくは40～80容量%である。

【0052】

また、洗浄液Wに含まれる塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましい。さらには、一価または二価のカチオンを含む塩が10mM以上含まれていることが好ましい。より好ましくは、塩が、塩化ナトリウムであり、さらには、この塩化ナトリウムが20mM以上含まれていることが好ましい。

【0053】

次に、精製蒸留水またはTEバッファ等の回収液をバレル10の開口11aから排出部24の開口21bへ向けて加圧エアにより通流させ、核酸を核酸吸着性多孔性膜Fから離脱させて流し出し、排出部24から排出された回収液（核酸を含有する回収液）を回収する。この際、前記したように、核酸分離精製カートリッジ1は、洗浄工程において洗浄液Wが残留し難いため、排出された回収液には洗浄液Wが混入し難くなる。例えば、洗浄工程において、エタノールが70容量%含まれた洗浄液W（500 μ l）を、60kPaの圧力エアにより通流させて洗浄した後、回収液であるTEバッファ（200 μ l）を、60kPaの圧力エアにより通流させて核酸を回収した場合は、排出された回収液中のエタノールの濃度は4容量%以下となった。この際に排出された回収液を用いて、次工程のPCRや逆転写酵素反応を行った結果、洗浄液W（エタノール）に起因する不具合は生じなかった。

【0054】

一方、比較例として、キャップ側嵌合部22の径方向に対するリブ26の傾斜角度 θ 1（図5参照）を0°にして、前記したように分離精製した場合は、排出された回収液中のエタノールの濃度は4容量%を超えていた。この排出された回収液を用いてPCRや逆転写酵素反応を行うと、収率の低下が見られた。

【0055】

このように、本実施形態の核酸分離精製カートリッジ1では、洗浄工程において、洗浄液Wが核酸分離精製カートリッジ1の内部に残留せずに、速やかに排出されるので、排出された回収液への洗浄液Wの混入を抑えることができる。これにより、次工程において、洗浄液Wに起因する不具合を未然に防ぐことができる。

【0056】

以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明は前記実施形態には限定されない。例えば、前記実施形態では、核酸吸着性多孔性膜を1枚収容した核酸分離精製カートリッジとしたが、核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジとしてもよい。この場合、収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

【0057】

また、前記実施形態では、バレルをキャップへ嵌入することにより筒状体を形成したが、本発明はこれに限定されない。例えば、キャップを金型に設置し、バレル部分をインサート成形により形成することによって、バレルとキャップとが一体成形されたものを筒状体として用いてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図である。

【図2】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。

【図3】本発明の一実施形態に用いられるキャップの拡大断面斜視図である。

【図4】図3のX-X線断面図である。

【図5】図2のA部における拡大図である。

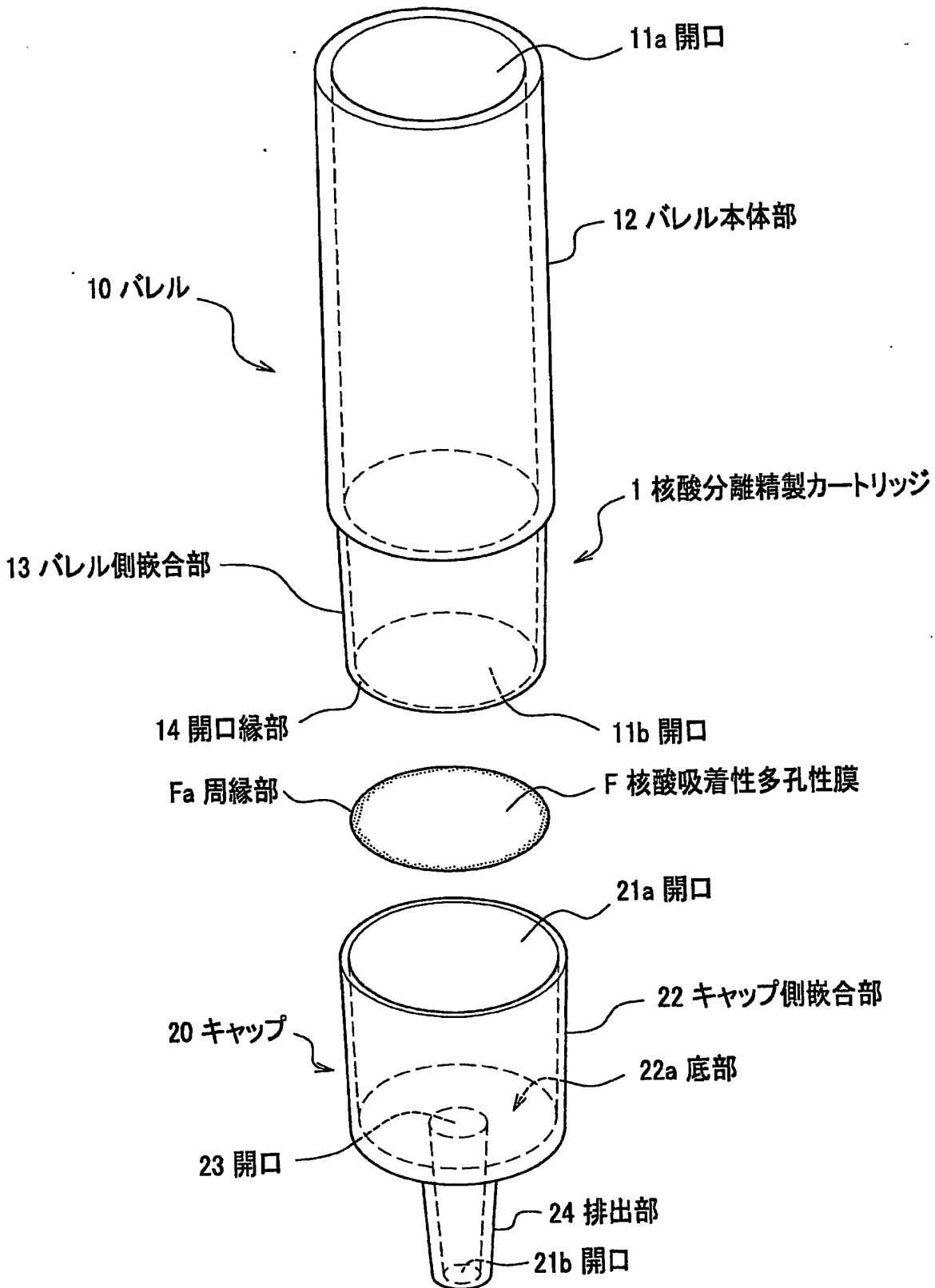
【図6】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの洗浄工程を示す断面図である。

【符号の説明】

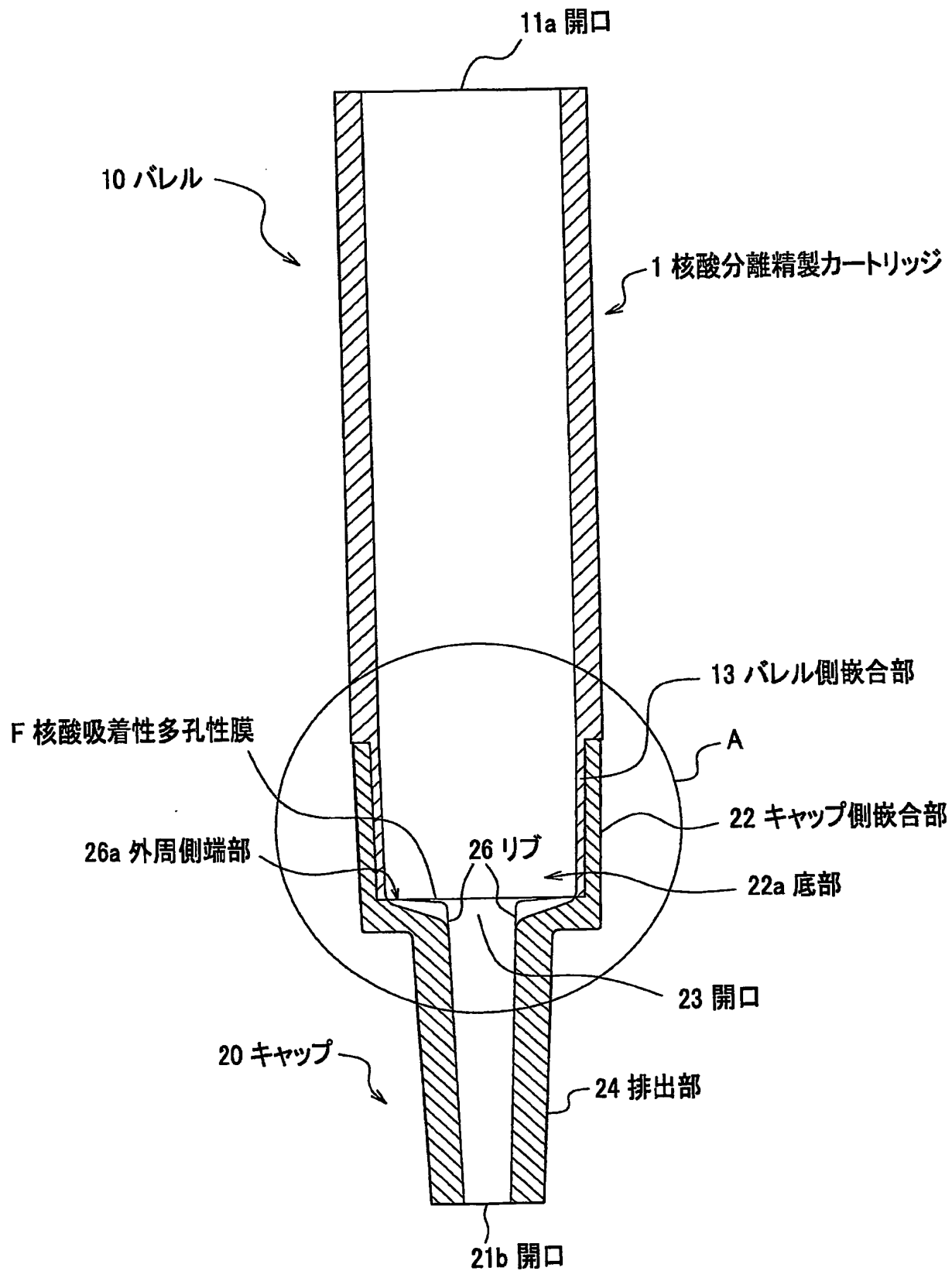
【0059】

- 1 核酸分離精製カートリッジ
- 10 バレル
- 11a 開口
- 12 バレル本体部
- 13 バレル側嵌合部
- 20 キャップ
- 21b 開口
- 22 キャップ側嵌合部
- 22a 底部
- 22b 底面
- 23 開口
- 24 排出部
- 26 リブ
- F 核酸吸着性多孔性膜

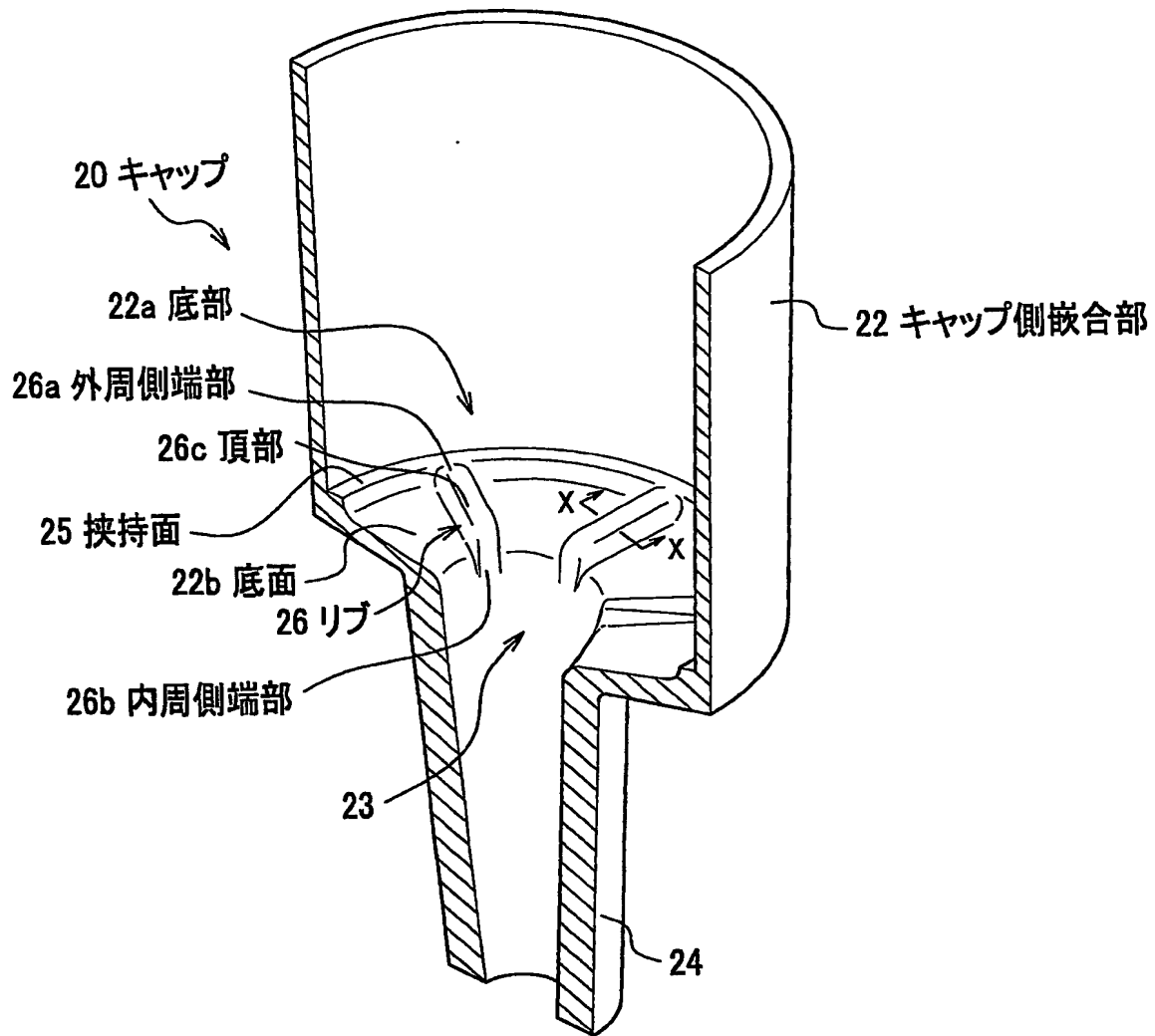
【書類名】 図面
【図 1】



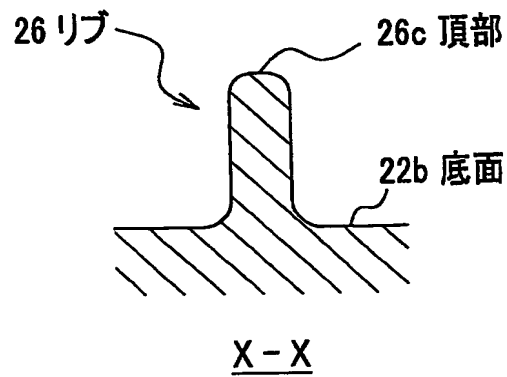
【図 2】



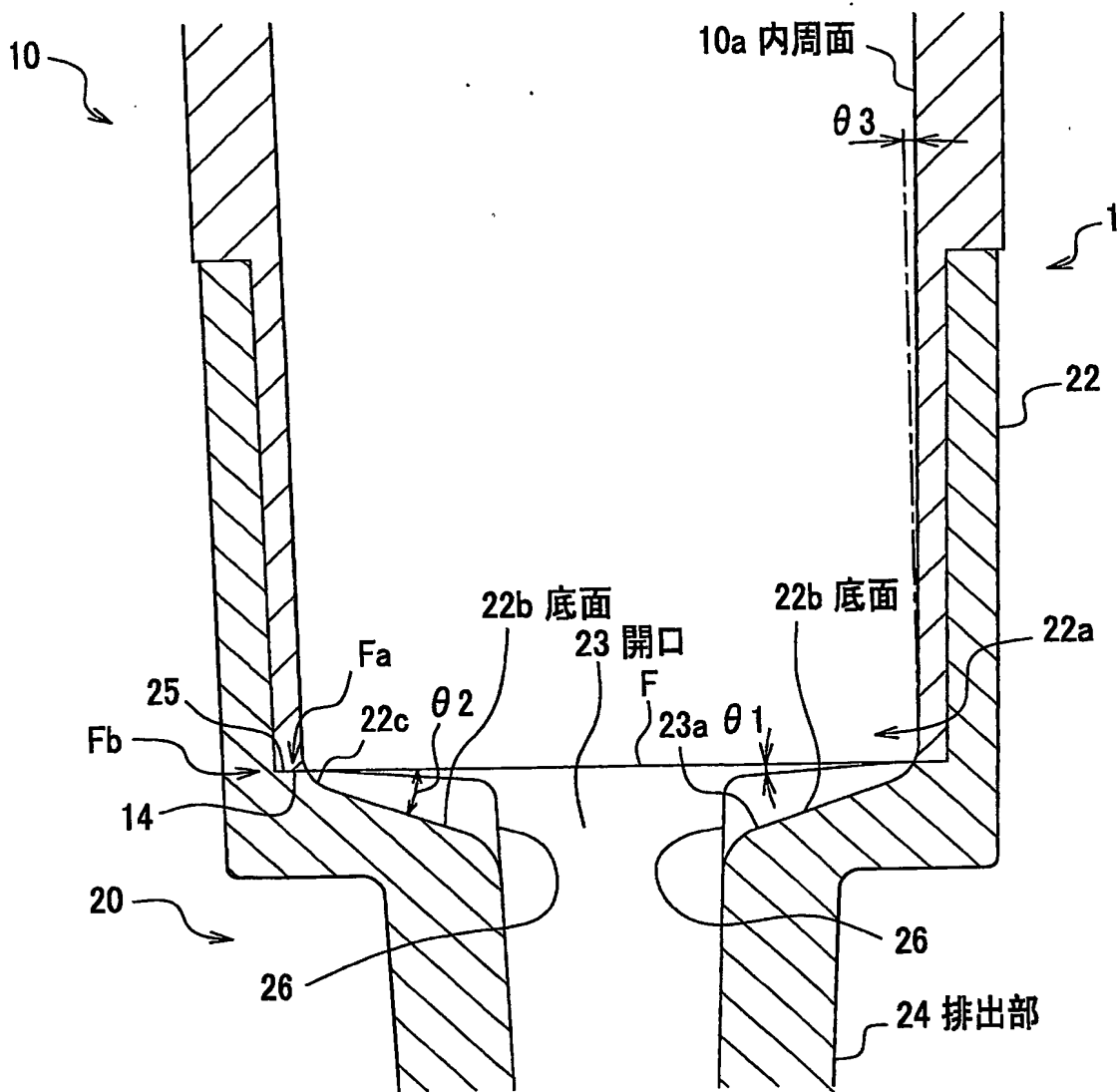
【図 3】



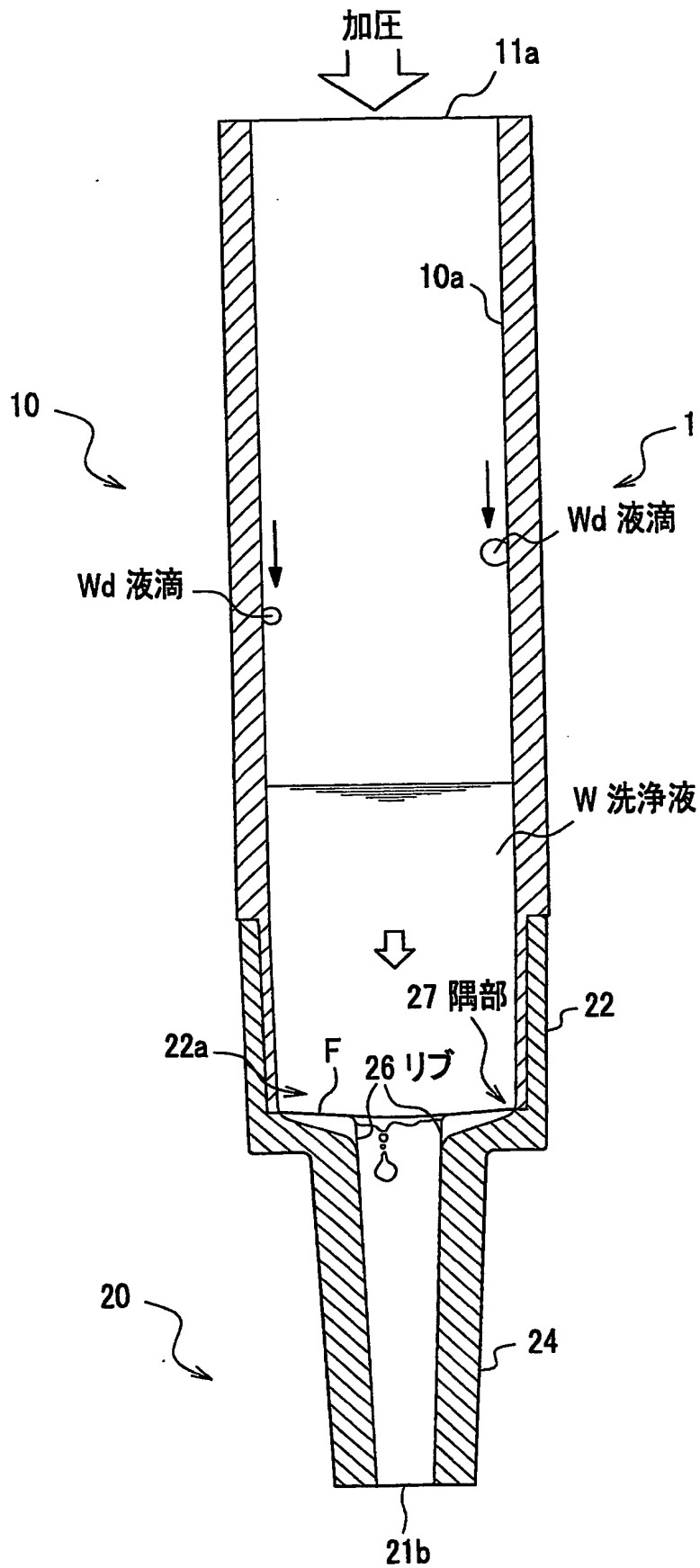
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 洗浄工程において、洗浄液が容器内に残留し難い（洗浄液が排出され易い）核酸分離精製カートリッジを提供する。

【解決手段】 キャップ 20 は、キャップ側嵌合部 22 の底面 22b に、6 本（図においては 3 本のみ図示）の放射状のリブ 26 が形成されている。このリブ 26 は、核酸分離精製カートリッジが組み立てられた状態において、それぞれの外周側端部 26a が核酸吸着性多孔性膜に当接し、この核酸吸着性多孔性膜を支持している。また、リブ 26 は、核酸分離精製カートリッジの使用時において、核酸吸着性多孔性膜が開口 23 に近付くほど排出部 24 の方へ変位するように、外周側端部 26a から内周側端部 26b に向けて、排出部 24 側に傾斜している。これにより、洗浄液が底部 22a に残留することなく、速やかに排出部 24 から排出される。

【選択図】 図 3

特願 2 0 0 3 - 3 6 0 5 5 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日
新規登録
神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地
富士写真フイルム株式会社